

2016年1月27日

ナノ材料の効率的な有害性評価技術: METIナノ安全プロジェクト研究成果報告

気管内投与試験によるナノ材料の有害性スクリーニング
気管内投与試験による材料間比較に基づく
同等性判断基準の検討

発表者: 大嶋 浩 (CERI)

一般財団法人 化学物質評価研究機構 (CERI)
国立研究開発法人 産業技術総合研究所 (AIST)
(ナノ材料研究部門、安全科学研究部門)

背景

一般化学物質の有害性

- 一般化学物質では、同一の化学式であれば、製法が変わっても同じ有害性を示し、一度有害性試験を実施すればその結果が共用できると考えられている。

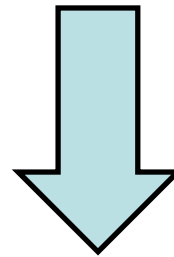
ナノ材料の健康影響への懸念

- その小ささから、従来の化学物質や材料とは異なる健康影響を及ぼす可能性がある。
- 同一の化学式であってもサイズ、形状、表面修飾等の物理化学的特性により発現する毒性が異なる可能性がある。

ナノ材料特有の懸念事項がある!!

目的

- 物理化学的特性の異なる材料ごとに有害性試験の実施が必要となるが、多種多様なナノ材料ごとに有害性試験を実施することは現実的ではない。
- 多数の新規ナノ材料の安全性を効果的・効率的に評価する新たな有害性の評価体制の構築が必要。



物理化学特性の異なるナノ材料について体系的な評価を行い、有害性が変わらないと考えられる物理化学的特性の範囲を明らかにして、ナノ材料の新たな有害性評価方法を構築する。

「ナノ材料の同等性判断基準」の構築

同等性判断基準の解析アプローチ

同一組成で物理化学的特性が異なる複数のナノ材料

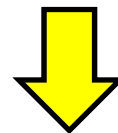
- 比較の対象とする物理化学的特性の値を解析

ラットを用いた気管内投与試験

- 肺の炎症性を主とした有害性評価
- 肺からのクリアランス解析

吸入ばく露試験は設備や費用の面で困難

- ✓ 材料ごとの有害性データを取得
- ✓ 材料間の特性的違いによる有害性発現の関連性を評価



同等性判断基準としてとりまとめ

ナノ材料選択・キャラクタリゼーション項目

選択したナノ材料

- 二酸化チタン 7種
- 酸化ニッケル 4種
- 二酸化ケイ素 9種

- ◆ 一般に広く用いられているもの
- ◆ 物理化学的特性の異なる材料が入手可能なもの

キャラクタリゼーション項目

「気管内投与試験のための試料調製技術」産総研 川口の報告より

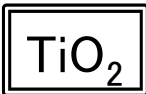
- ・ 1次粒子径、2次粒子径、比表面積、表面分析、ゼータ電位、等電位点等

(OECD WPMN (Sponsorship Program), ISO/TC229 (TR13014) の項目を参照)

試験方法及び材料

動物	<ul style="list-style-type: none"> ・ラット (F344/DuCrI CrIj、♂、12週齢) 30匹/用量
ナノ材料の投与用量	<ul style="list-style-type: none"> ・TiO₂, NiO 0、0.67、2、6 mg/kg b.w. ・SiO₂ 0、0.22、0.67、2 mg/kg b.w. (一部で最大6 mg/kg b.w.)
投与	<ul style="list-style-type: none"> ・1～2 mL/kg b.w.の液量を気管内に単回投与
解剖時期	<ul style="list-style-type: none"> ・投与3日後、28日後、13週後
検査項目	<ul style="list-style-type: none"> ・病理学的検査 (剖検、器官重量、組織検査) ・BAL検査 (細胞検査、生化学検査) ・体内動態検査 (肺からのクリアランス)

BAL (Bronchoalveolar Lavage): 気管支肺胞洗浄・・・肺の炎症、障害等の検査



ナノ材料:二酸化チタン (TiO₂)

媒体 : 2 mg/mL リン酸二ナトリウム水溶液

材料	比表面積 (m ² /g)	一次粒子径 (nm) ^{a)}	二次粒子径 (nm) ^{b)}	ゼータ電位 (mV)	等電位点	形状	表面処理	結晶型
A	205.5	7.5	68.5	-22.4	pH=6.3	球状	無し	アナターゼ
B	121.2	25.3	54.6	-37.9	pH=5.9	紡錘状	無し	ルチル
C1	94.4	26.5	45.8	-40.2	pH=5.0	紡錘状	無し	ルチル
C2	94.4	27.8	98.5	-41.3	pH=8.6	紡錘状	Al(OH) ₃	ルチル
D	59.1	24.2	69.6	-43.7	pH=6.5	球状	無し	アナターゼ/ ルチル
E	9.3	467.7	289.1	-47.2	pH=8.3	球状	無し	ルチル
F	16.7	996.6	231.1	-51.0	pH=3.6	針状	無し	ルチル

a) SEM又はTEM実測値

b) 投与液中DLS個数平均

材料C2はC1の表面をAl(OH)₃でコートしたもの

BAL検査

6 mg/kg群：総細胞数（炎症細胞）

図省略

- ✓ 材料A～Fの投与3日後、28日後、13週後の結果グラフ（縦軸:対照群比、横軸:解剖日）
- ✓ 各材料について、各対照群との比率で表記

- ・投与3日後では、増加がみられた。（材料Eではごく軽度）
- ・投与28日後以降は、**材料C2で投与13週後まで増加が継続してみられた。（＝炎症の継続）**
- ・他の材料は、投与28日後以降は減少して対照群と同程度であった。

肺の病理組織学的検査

	材料C1	材料C2
投与3日後 (6 mg/kg b.w.)	<p>省略 肺組織写真</p> <p>炎症、ナノ粒子の貪食細胞</p>	<p>省略 肺組織写真</p> <p>炎症、ナノ粒子の貪食細胞</p>
投与13週後 (6 mg/kg b.w.)	<p>省略 肺組織写真</p> <p>ナノ粒子の貪食細胞</p>	<p>省略 肺組織写真</p> <p>炎症、ナノ粒子の貪食細胞</p>



ナノ材料の肺からのクリアランス ©2016 CERI, Japan

図省略

- ✓ 材料A~Fの結果グラフ（縦軸:肺クリアランス[1/day]、横軸:投与用量[mg/kg]）

- いずれの材料とも、用量が高くなるにつれてクリアランス率が低下する傾向がみられた。
- **材料C2**では、他の材料よりも**クリアランス率が低い**傾向がみられた。

ナノ二酸化チタンのまとめ

- ナノ二酸化チタンは、急性期に肺の軽度な炎症を引き起こすが、亜急性期以降では炎症はみられない。
- 表面処理されたナノ二酸化チタンでは亜急性期以降も炎症が継続してみられた。(肺クリアランスも低下傾向)
- 多変量解析により物理化学特性の肺有害性への相関を調べた結果、粒子径が肺有害性の程度に影響していた。

同等性判断基準	
表面処理がない	• <u>既存のナノ二酸化チタンと同等と判断できる。</u> →肺有害性の程度は粒子径に依存
表面処理がある	• <u>既存のナノ二酸化チタンと同等とは判断できない。</u> →全ての材料で有害性評価が必要
➤ 形状、結晶型等の有害性への寄与は少ない。	

ナノ材料:酸化ニッケル (NiO)

媒体：超純水

材料	比表面積 (m ² /g)	一次粒子径 (nm) ^{a)}	二次粒子径 (nm) ^{b)}	ゼータ電位 (mV)	等電位点	形状	表面処理	結晶型
G	92.7	(9.6)	39.5	37.2	pH>12.5	球状	無し	NaCl構造
H	50.5	20	48.9	32.5	pH>12.5	不定形	無し	NaCl構造
I	6.6	139.0	1635	データ無し	データ無し	不定形	無し	NaCl構造
J	179	29 X 241	データ無し	データ無し	データ無し	線維状	無し	NaCl構造

a) SEM又はTEM実測値、()は比表面積換算粒径

b) 投与液中DLS個数平均

BAL検査

6 mg/kg群：総細胞数（炎症細胞）

図省略

- ✓ 材料G~Jの投与3日後、28日後、13週後の結果グラフ（縦軸:対照群比、横軸:解剖日）
- ✓ 各材料について、各対照群との比率で表記

- ・投与3日後では、増加がみられた。（材料Iではごく軽度）
- ・材料G、Hでは、投与13週後まで増加が持続してみられた。（＝炎症の持続）
- ・材料Jでは、投与13週後では減少して対照群と同程度であった。

肺の病理組織学的検査

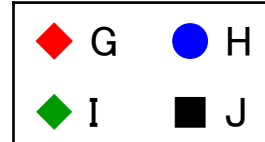
	材料G	材料J
投与3日後 (6 mg/kg b.w.)	<p>省略 肺組織写真</p> <p>炎症、ナノ粒子の貪食細胞</p>	<p>省略 肺組織写真</p> <p>炎症、ナノ粒子の貪食細胞</p>
投与13週後 (6 mg/kg b.w.)	<p>省略 肺組織写真</p> <p>炎症、ナノ粒子の貪食細胞</p>	<p>省略 肺組織写真</p> <p>ナノ粒子の貪食細胞</p>

ナノ材料の肺からのクリアランス及び溶解性

肺クリアランス

図省略

- ✓ 材料G~Jの結果グラフ（縦軸:肺クリアランス[1/day]、横軸:投与用量[mg/kg]）



- 材料Jは他の材料と比較して高いクリアランス率を示した。

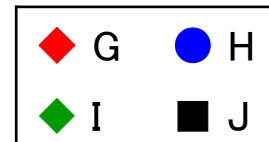
溶解量 (仕込み濃度 約500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

図省略

- ✓ 超純水
- ✓ 材料G~Jの結果グラフ（縦軸:液中イオン態Ni濃度 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]、横軸:経過時間[hr]）

図省略

- ✓ リソソーム液
- ✓ 材料G~Jの結果グラフ（縦軸:液中イオン態Ni濃度 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]、横軸:経過時間[hr]）



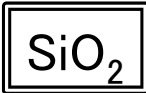
- 材料Jはリソソーム液に対し他の材料と比較して高い溶解性を示した。
- 生理食塩水、過酸化水素に対しては、いずれの材料も超純水と同様の傾向を示した。

ナノ酸化ニッケルのまとめ

- ナノ酸化ニッケルは、急性期～亜慢性期にかけて肺の炎症を引き起こす。
- リソソーム液に対し高い溶解性を示すナノ酸化ニッケルでは肺クリアランスも高く、亜急性期以降の肺の炎症反応に回復傾向がみられた。
- 多変量解析により物理化学特性の肺有害性への相関を調べた結果、粒子径が肺有害性の程度に影響していた。

同等性判断基準	
溶解性 ^{a)} が低い	<ul style="list-style-type: none"> • <u>既存のナノ酸化ニッケルと同等と判断できる。</u> →肺有害性の程度は粒子径に依存
溶解性 が高い	<ul style="list-style-type: none"> • <u>既存のナノ酸化ニッケルと同等とは判断できない。</u> →有害性が回復する可能性有り
<p>➤ 形状、表面処理等の有害性への寄与については不明。(未検討)</p>	

a) リソソーム液に対する溶解性



ナノ材料:二酸化ケイ素 (SiO₂)

材料	比表面積 (m ² /g)	一次粒子径 (nm) ^{a)}	二次粒子径 (nm) ^{b)}	ゼータ電位 (mV)	等電位点	形状	表面処理	結晶型	結晶度 (%)
K1	18.8	218	222	-27.4	pH<1.0	不定形	無し	結晶質 ^{c)}	77.8
K2	33.8	251	231	-55.6	pH=1.31	不定形	無し	結晶質 ^{c)}	59.1
K3	153.6	(14.7)	58.8	-44.8	pH=1.23	不定形	無し	結晶質 ^{c)}	60.9
L1	6.1	264	481	-32.2	pH<1.0	不定形	無し	結晶質 ^{c)}	89.0
L2	23.3	170	220	-28.2	pH<1.0	不定形	無し	結晶質 ^{c)}	70.3
M1	68.7	58.4	64	-36.2	pH=3.75	球形	無し	非晶質	データ無し
M2	75.3	59.8	53.6	-45.1	pH=2.34	球形	COOH	非晶質	データ無し
M3	231.2	52.8	66.8	-37.4	pH<1.0	球形	Al(OH) ₃	非晶質	データ無し
N	275.4	13.5	9.9	-25.7	pH=3.49	球形	無し	非晶質	データ無し

a) SEM又はTEM実測値、()は比表面積換算粒径

b) 投与液中DLS個数平均

c) α石英

- 材料K2はK1の大粒子を除去してボールミル粉碎後、遠心分離で大粒子を除去したもの
- 材料K3はK2をNaOH温水溶液中で溶解(非晶質成分の除去)したもの
- 材料L2はL1を遠心分離して大粒子を除去したもの
- 材料M2、M3はM1に表面修飾したもの

BAL検査

6 mg/kg群：総細胞数（炎症細胞）

結晶質SiO₂

図省略

- ✓ 材料K1～L2の投与3日後、28日後、13週後の結果グラフ（縦軸：対照群比、横軸：解剖日）
- ✓ 各材料について、各対照群との比率で表記

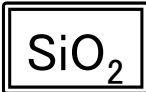
- ・投与3日後では、材料K1、K3、L2で増加がみられた。（材料K2、L1ではごく軽度）
- ・材料K1では、投与13週後まで増加が持続してみられた。（＝炎症の持続）
- ・材料L1では、投与13週後に増加がみられた。
- ・他の材料では投与28日後以降は減少して対照群と同程度であった。

非晶質SiO₂

図省略

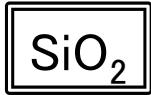
- ✓ 材料M1～Nの投与3日後、28日後、13週後の結果グラフ（縦軸：対照群比、横軸：解剖日）
- ✓ 各材料について、各対照群との比率で表記

- ・投与3日後では、材料M1、Nで増加がみられた。（材料M2、M3はごく軽度）
- ・投与28日後以降は、全ての材料で減少して対照群と同程度であった。



肺の病理組織学的検査

	材料K1 (結晶質)	材料K2 (結晶質)	材料M1 (非晶質)
投与3日後 (6 mg/kg b.w.)	<p>省略 肺組織写真</p> <p>炎症、 ナノ粒子の貪食細胞</p>	<p>省略 肺組織写真</p> <p>炎症無し</p>	<p>省略 肺組織写真</p> <p>炎症、 ナノ粒子の貪食細胞</p>
投与13週後 (6 mg/kg b.w.)	<p>省略 肺組織写真</p> <p>炎症、 ナノ粒子の貪食細胞</p>	<p>省略 肺組織写真</p> <p>炎症無し</p>	<p>省略 肺組織写真</p> <p>炎症無し</p>



ナノ材料の肺からのクリアランス

©2016 CERI, Japan

図省略

- ✓ 材料K1~Nの結果グラフ（縦軸:肺クリアランス[1/day]、横軸:投与用量[mg/kg]）

- ほとんどの材料で、用量が高くなるにつれてクリアランス率が低下する傾向がみられた。
- 非晶質シリカでは、結晶質シリカよりもクリアランス率が高い傾向がみられた。

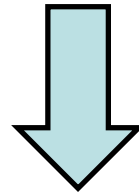
非晶質ナノ二酸化ケイ素のまとめ

- ナノ二酸化ケイ素(非晶質)は、急性期に肺の軽度な炎症を引き起こすが、亜急性期以降では炎症はみられない。
- 表面処理されたナノ二酸化ケイ素では急性期炎症の程度の減弱がみられた。
- 多変量解析により物理化学特性の肺有害性への相関を調べた結果、粒子径が肺有害性の程度に影響していた。

同等性判断基準	
表面処理がない	<ul style="list-style-type: none"> • <u>既存のナノ二酸化ケイ素と同等と判断できる。</u> →肺有害性の程度は粒子径に依存
表面処理がある	<ul style="list-style-type: none"> • <u>既存のナノ二酸化ケイ素と同等とは判断できない。</u> →全ての材料で有害性評価が必要
<p>➤ 形状、結晶型等の有害性への寄与は少ない。</p>	

結晶質二酸化ケイ素のまとめ

二酸化ケイ素(結晶質)は、亜急性期以降にも継続した肺の炎症反応がみられたが、材料により様々な有害性パターンを示した。



今回の検討では、物理化学的特性のの違いに関連した変動は不明

まとめ

- 表面処理された材料と処理のない材料とでは異なる有害性パターンを示す傾向がみられた。
 - ⇒ 表面処理された材料の有害性は、未処理の材料の有害性情報からは類推できない。
- いずれの材料とも肺の炎症の発現の強さと粒子径との間に相関がみられた。
 - ⇒ 粒子径のみが異なる材料では、他の材料の有害性情報から肺炎症性の強さを類推できる。

有害性が強い材料でも表面処理や粒子径を
変えることで有害性を軽減できる可能性